

1H-NMRスペクトルの一次解析のための支援プログラム(5)

著者	傘 孝之
雑誌名	日本歯科大学紀要．一般教育系
巻	32
ページ	51-56
発行年	2003-03-20
URL	http://doi.org/10.14983/00000572

^1H -NMR スペクトルの一次解析のための支援プログラム 5

A Program for Assisting in First Order Analysis of ^1H -NMR Spectrum 5

歯学部 傘 孝之

Takayuki KARAKASA

*Department of Chemistry, The Nippon Dental University,
Fujimi 1-9-20, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, JAPAN*

(2002 年 11 月 28 日 受理)

It is important to determine accurate chemical shifts and coupling constants of the ^1H -NMR spectrum in order to analyze the structure of organic compounds. We have been developed the supporting program for analysis of the AMX type protons in the ^1H -NMR spectrum. The analysis of the spectrum which had overlapped more than the 4 protons was difficult for the algorithm of this program. In this work, we developed the algorithm to analyse the spectrum of more than the 4 protons.

有機化合物の一次元 ^1H -NMRスペクトルから正確なケミカルシフト値とカップリング定数を読みとることは、その立体構造を解析するために非常に重要である。著者は、以前から、この作業をコンピュータに肩代わりさせるためのプログラムの開発を行ってきた。1999年、分離して現れるAMX型 ^1H -NMRスペクトルの10重線までのカップリング定数とケミカルシフトを解析するプログラムを報告した¹⁾。さらに、AMX型プロトンが2つまたは3つ重なったスペクトルを解析して個々のプロトンのカップリング定数とケミカルシフトを推定するプログラムを開発し、更に10重線までしか解析できなかったプログラムを、短時間で16重線まで解析できるように改良し、プログラム名AMXとして報告した²⁾。このプログラムでは、不純物を含まないサンプルのAMX型のスペクトルパターンしか解析できなかった。しかし、日常の研究では、常に高純度に精製したサンプルで測定するとは限らず、少量の不純物を含むサンプルで測定し、そのデータを解析する場合が多い。そこで、AMX型のスペクトルパターン中に微量の不純物が含まれていても、解析可能なプログラムを開発した³⁾。昨年、スペクトルチャート上ではピークとして判別できるが、ピークデータ表に出力するとピークが欠落しているAMX型スペクトルを解析するプログラムを開発した(プログラム名:AMX-S)⁴⁾。しかし、AMX型のプロトンが4つ以上重なったスペクトルは従来報告した計算アルゴリズムでは、実用時間内(数時間以内)で計算することができなかった。

今回、AMX型のプロトンが4つ以上重なったスペクトルの解析が可能なアルゴリズムを開発したので報告する。

プログラム言語

FORTRAN77 (Absoft 社製, Ver. 4.6)

使用機種

Macintosh PowerPC 7100/AV, 7600/200

計算方法と適用限界

著者らが以前開発したアルゴリズム²⁾では、重なり合っているAMX型のスペクトルピークの中から対称であるピークの組み合わせを全て探し出し、探し出した全ての組み合わせに対してカップリング定数を計算するため、解析するピークの本数の増加とともに組み合わせの数が幾何級数的に増大する。そして、その数が37本を越えると、計算する組み合わせの数が100億を超える数となり、実用時間内に計算を終了する事は、不可能となる。通常、解析するピークの本数が37本を越えるのは、AMX型のプロトンが4つ以上重なったスペクトルの場合である。そこで、今回スペクトルピーク数が37本以上あっても解析可能なアルゴリズムの開発を検討した。

AMX型のプロトンのピーク幅は、このプロトンのカッ

プリング定数の和であることを利用して解析するプログラムを開発した。実際には、ピークの総数が 31 本を越えると、10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 本のいずれかで分割したファイルを作り、それぞれのファイルに含まれるピークに可能なケミカルシフト値とカップリング定数を計算する。その際、分割した位置にかかっているプロトンピークの読み落としを防ぐために、分割位置を中点とするファイルも作成する。次に、開発したプログラムで実際のスピン系の解析を行った。

解析例としては、オリゴ糖誘導体 NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc-PA を使った⁹⁾。この化合物は、¹H-NMR スペクトルの全プロトンが解析されており、このスペクトルの δ 3.49 ~ 4.03ppm では、AMX 型のプロトンが 21 個重なり合っている (図 1, 表 1)。

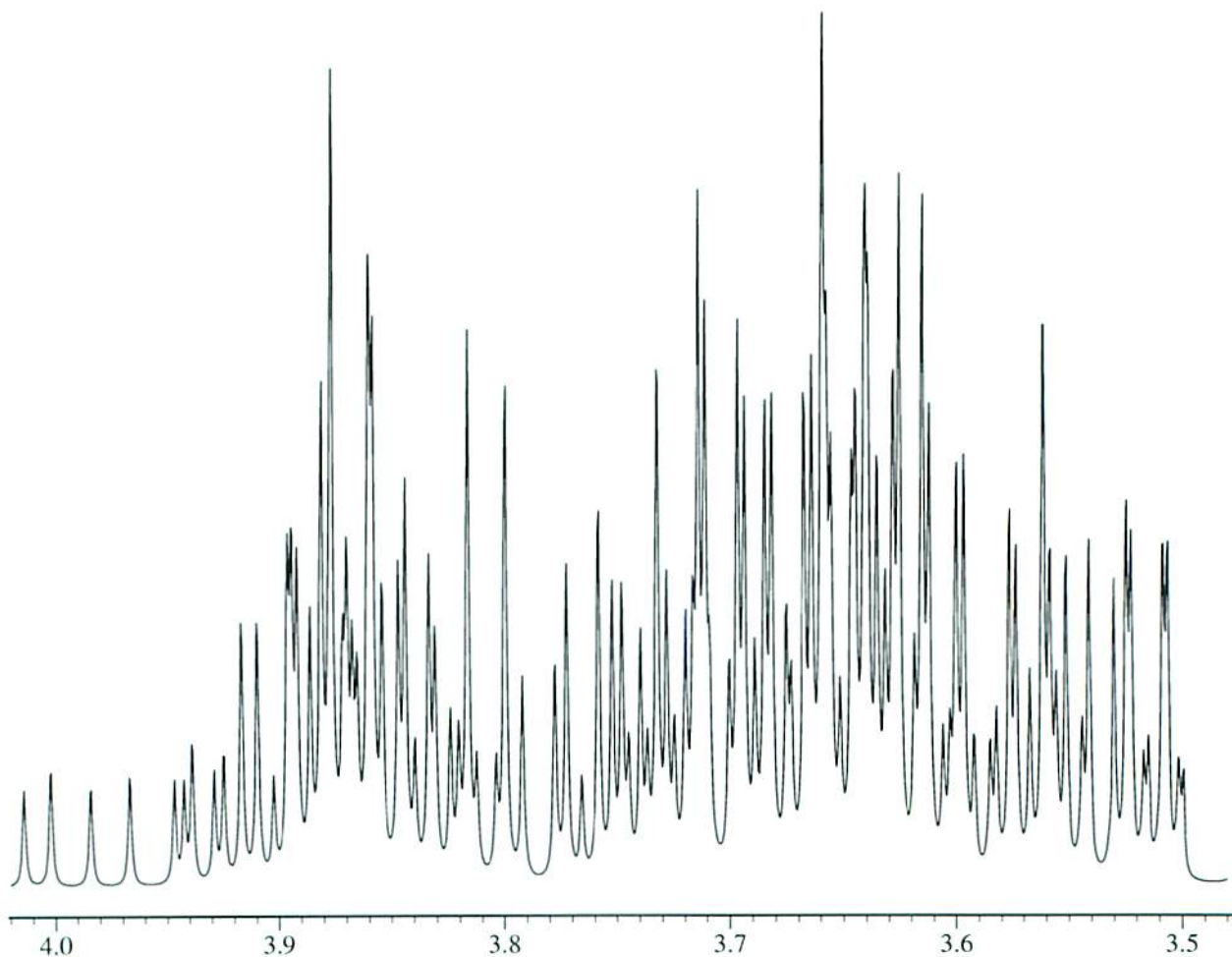
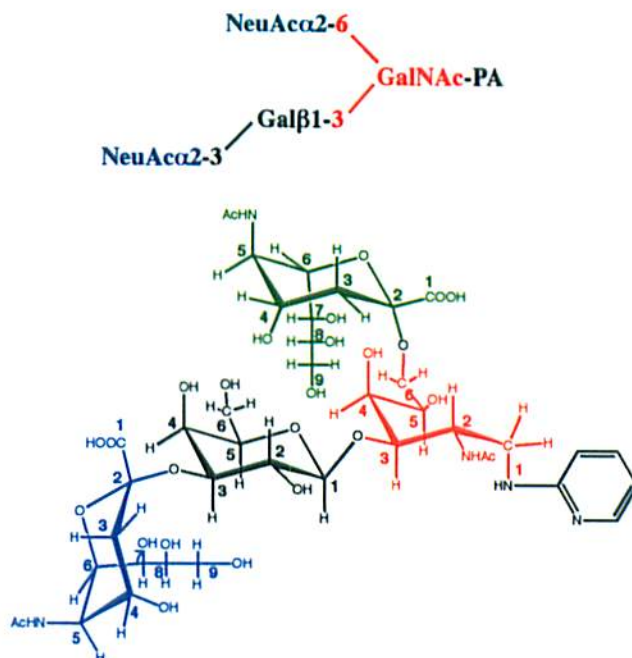


図 1 NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc-PA の 600MHz ¹H-NMR スペクトル

表1 NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc-PA の 600MHz ¹H-NMR スペクトルピークデータ

Hz	Int	Hz	Int	Hz	Int
2408.473	23.400	2279.811	121.100	2184.457	133.900
2401.336	29.000	2275.235	47.700	2183.542	108.200
2390.537	24.600	2266.633	52.700	2181.163	91.600
2380.105	26.700	2263.522	73.600	2178.967	57.500
2368.209	24.100	2259.496	23.800	2176.954	107.900
2365.464	22.800	2254.920	90.200	2175.307	153.400
2363.268	34.000	2251.260	67.400	2171.097	44.300
2357.411	25.600	2248.697	67.700	2169.084	153.800
2354.849	31.100	2246.867	28.800	2167.254	100.800
2350.090	63.500	2243.756	55.100	2163.593	29.100
2345.881	63.600	2241.926	26.500	2161.763	28.000
2341.488	22.400	2239.363	124.200	2160.116	93.300
2337.645	66.700	2236.801	65.200	2158.103	95.800
2336.547	67.600	2234.788	31.900	2155.357	31.400
2335.083	69.800	2231.860	59.900	2151.148	30.000
2331.605	58.100	2229.846	50.800	2149.501	35.900
2328.677	110.300	2228.382	146.400	2146.023	85.100
2326.115	189.000	2226.552	119.800	2144.193	74.600
2323.003	43.600	2225.271	40.200	2140.533	45.100
2321.905	65.000	2220.146	45.400	2137.055	135.100
2320.441	44.400	2217.950	122.000	2135.225	69.000
2319.160	41.200	2216.120	102.000	2133.578	38.200
2316.232	129.200	2213.375	47.000	2131.016	77.100
2315.133	108.400	2210.812	105.900	2126.806	32.900
2312.571	66.100	2208.982	107.600	2124.976	79.500
2308.179	67.700	2205.139	57.900	2118.387	70.700
2306.349	88.700	2203.858	39.800	2115.093	80.100
2303.786	29.000	2200.380	110.300	2113.812	71.100
2300.126	71.200	2198.367	108.600	2110.518	23.800
2298.479	55.200	2195.622	184.800	2109.236	28.600
2294.452	37.400	2194.524	93.200	2105.576	74.600
2292.256	30.900	2193.242	80.500	2104.295	73.200
2289.877	127.400	2190.863	35.500	2101.376	25.200
2287.497	24.600	2187.935	76.400	2100.085	23.200
2282.190	25.200	2186.837	98.100		

表1のピークデータの入力ファイルを作成し、本プログラム(AMX-M)を以下の手順に従って実行した。

```
*****
**          AMX-M program          **
** Data input and analysis of overlapped protons **
*****
*
* Initial calculation of overlapped protons - - 1 *
*
* Analysis of calculated data - - - - 2 *
*
*          End - - - - 3 *
*
*          select number 1-3 *
*****
1
-----
* Analysis of overlapped protons *
-----

Input file name please
(*_MULT* part of file name is an unnecessary.)
```

```
S
Number of lines / 1 BLOCK
(10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 OR 30)
20

!!! Over of 31 for absorption lines !!!
- - Separation of Data ( 10 block) - -

Width of block
BLOCK 1      86.57 Hz
BLOCK 2      47.40 Hz
BLOCK 3      60.94 Hz
BLOCK 4      62.59 Hz
BLOCK 5      45.94 Hz
BLOCK 6      43.01 Hz
BLOCK 7      41.55 Hz
BLOCK 8      47.40 Hz
BLOCK 9      52.53 Hz
BLOCK 10     35.14 Hz
1 / 10
2 / 10
```

```

3 / 10
4 / 10
5 / 10
6 / 10
7 / 10
8 / 10
9 / 10
10 / 10

```

```

*****
*                                     *
* Please select analytical methods   *
*                                     *
*   Automatic analysis   - - - 1    *
*   (Only 2 or 3 protons)           *
*                                     *
*   Manual analysis      - - - 2    *
*                                     *
*****

```

```

2                                     10
Total calculation numbers = 110
- - - Calculation done - - -
Total calculation numbers = 231
- - - Calculation done - - -
Total calculation numbers = 160
- - - Calculation done - - -
Total calculation numbers = 146
- - - Calculation done - - -
Total calculation numbers = 236
- - - Calculation done - - -
Total calculation numbers = 223
- - - Calculation done - - -
Total calculation numbers = 278
- - - Calculation done - - -
Total calculation numbers = 217
- - - Calculation done - - -
Total calculation numbers = 183
- - - Calculation done - - -
Total calculation numbers = 94
- - - Calculation done - - -

```

上記の計算では、元のピークファイル(ファイル名:s)を20本ずつのファイルBLOCK 1～BLOCK 10の10個のファイルに分ける。各ブロックのピーク幅は次のようになる。

```

BLOCK 1  86.57 Hz
BLOCK 2  47.40 Hz
BLOCK 3  60.94 Hz
BLOCK 4  62.59 Hz
BLOCK 5  45.94 Hz
BLOCK 6  43.01 Hz
BLOCK 7  41.55 Hz
BLOCK 8  47.40 Hz
BLOCK 9  52.53 Hz
BLOCK 10 35.14 Hz

```

各ブロックの可能なケミカルシフト値とカップリング定数を計算し、結果を次の10個のファイルとして出力した。

```

s_M_01_FNAL
s_M_02_FNAL
s_M_03_FNAL
s_M_04_FNAL
s_M_05_FNAL
s_M_06_FNAL
s_M_07_FNAL
s_M_08_FNAL
s_M_09_FNAL
s_M_10_FNAL

```

この解析データ中に、文献に示されているケミカルシフト値とカップリング定数(表2)⁹⁾が含まれているかどうかを検証した。

表2 ケミカルシフト値とカップリング定数の文献値

	δ (ppm)	J(Hz)		
GalNAc H-1	3.63	7.68	-13.95	
GalNAc H-1'	3.64	8.07	-13.95	
GalNAc H-6	3.85	7.65	-10.05	
Gal H-2	3.64	7.80	10.00	
Gal H-5	3.63	4.50	7.93	
Gal H-6	3.78	7.93	-11.74	
Gal H-6'	3.73	4.50	-11.45	
NeuAc-3 H-4	3.67	4.69	10.40	
NeuAc-3 H-5	3.88	10.40	10.50	
NeuAc-3 H-6	3.68	1.69	10.50	
NeuAc-3 H-7	3.61	1.69	8.95	
NeuAc-3 H-8	3.88	2.63	6.06	8.95
NeuAc-3 H-9	3.74	2.63	-11.83	
NeuAc-3 H-9'	3.55	6.06	-11.83	
NeuAc-6 H-4	3.71	4.70	9.93	
NeuAc-6 H-5	3.82	9.93	10.17	
NeuAc-6 H-6	3.70	1.46	10.17	
NeuAc-6 H-7	3.57	1.46	9.09	
NeuAc-6 H-8	3.86	2.78	6.24	9.09
NeuAc-6 H-9	3.79	2.78	-12.01	
NeuAc-6 H-9'	3.63	6.24	-12.01	

注 GalNAc:NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc-PA
Gal :NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc-PA
NeuAc3:NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc-PA
NeuAc6:NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc-PA

検証のために、今回データ抽出用プログラム(OLIGSUG)を作成した。このプログラムを実行すると、

```
Input file name please
(*_MULT.LOG* part of file name is an unnecessary.)
s
```

```
Range of chemical shift (ppm)
START
3.6
END
3.7
3.600 -> 3.700 ppm
Splitting pattern
d - - - 1      dd - - - 2      ddd - - - 3
dddd - - - 4   dddddd - - - 5
2
J1=
7.68
Error (normal +- 1 Hz)
1
J2=
13.95
Error (normal +- 1 Hz)
1
J 1      6.68 <---> 8.68 Hz
J 2     12.95 <---> 14.95 Hz
```

```
Output file name ?
galnacH-1,1'
10
OK 1
OK 2
OK 3
OK 4
OK 5
OK 6
OK 7
OK 8
OK 9
OK 10
```

ファイル名 galnacH-1,1' に結果が出力される。

```
3.600 -> 3.700 ppm      2 protons
J 1      6.68 <---> 8.68 Hz
J 2     12.95 <---> 14.95 Hz
4
2176.954
2184.457
2190.863
2198.367
Chemical shift =      3.646 ppm
J=      7.504 13.909
4
2163.593
2171.097
2176.954
```

```
2184.457
Chemical shift =      3.623 ppm
J=      7.504 13.361
```

同様に、残り 20 プロトンすべてについて実行し、結果を表 3 に示した。

表 3 ケミカルシフト値とカップリング定数の比較
(太字：文献値⁵⁾、斜体：本プログラムの解析値)

	δ (ppm)	J(Hz)		
GalNAc H-1	3.63	7.68	-13.95	
	3.62	7.50	13.36	
GalNAc H-1'	3.64	8.07	-13.95	
	3.65	7.50	13.91	
GalNAc H-6	3.85	7.65	-10.05	
	3.85	7.78	10.16	
Gal H-2	3.64	7.80	10.00	
	3.64	7.60	9.98	
Gal H-5	3.63	4.50	7.93	
	3.62	3.75	7.96	
Gal H-6	3.78	7.93	-11.74	
	3.78	8.60	11.71	
Gal H-6'	3.73	4.50	-11.45	
	3.74	4.48	11.99	
NeuAc-3 H-4	3.67	4.69	10.40	
	3.66	4.76	9.52	
NeuAc-3 H-5	3.88	10.40	10.50	
	3.89	9.88	9.88	
NeuAc-3 H-6	3.68	1.69	10.50	
	3.67	1.28	10.62	
NeuAc-3 H-7	3.61	1.69	8.95	
	3.61	1.92	9.06	
NeuAc-3 H-8	3.88	2.63	6.06	8.95
	-	-	-	
NeuAc-3 H-9	3.74	2.63	-11.83	
	3.74	2.56	11.90	
NeuAc-3 H-9'	3.55	6.06	-11.83	
	3.57	5.22	10.71	
NeuAc-6 H-4	3.71	4.70	9.93	
	3.71	5.03	9.61	
NeuAc-6 H-5	3.82	9.93	10.17	
	3.82	10.25	10.25	
NeuAc-6 H-6	3.70	1.46	10.17	
	3.70	1.83	10.43	
NeuAc-6 H-7	3.57	1.46	9.09	
	3.57	1.83	8.97	
NeuAc-6 H-8	3.86	2.78	6.24	9.09
	-	-	-	
NeuAc-6 H-9	3.79	2.78	-12.01	
	3.81	2.29	12.35	
NeuAc-6 H-9'	3.63	6.24	-12.01	
	3.62	7.96	11.62	

表 3 に示したように, dd で現れる 19 プロトン分は, 抽出解析できたが, ddd で現れる残り 2 プロトン分の NeuAc-3 と NeuAc-6 の H-8 プロトンは抽出解析できなかった。これは, dd に比べて ddd は, 分裂本数が多くなるため dd に比べてピーク強度が弱くなり, その結果 ddd のピークの大部分が重なり合った吸収ピークに隠れるために(図 1 参照), 適切に抽出できなかったと思われる。吸収ピーク強度にかなりの違いがある場合には, 小さいピークが読みとれなくなるが, ほぼ同じような吸収強度を持つピークは, 確実にデータを抽出解析することができることがわかった。

今後, 今回抽出解析できなかった小さいピークも抽出解析できるアルゴリズムを開発する予定である。

謝辞

本プログラムの作成にあたり適切なるご助言を賜りました薩摩林貞美 名誉教授に感謝の意を表します。

文献

1. 傘 孝之, 日本歯科大学紀要, **28**, 75 (1999).
2. 傘 孝之, 日本歯科大学紀要, **29**, 107(2000).
3. 傘 孝之, 日本歯科大学紀要, **30**, 99(2001).
4. 傘 孝之, 日本歯科大学紀要, **31**, 101(2002).
5. I. Ishii-Karakasa, H. Iwase & K. Hotta, European Journal of Biochemistry, **247**(2), 709(1997).

このプログラムおよびプログラムソースは,
<ftp://ftp.ndu.ac.jp/pub/chemistry> に掲載します。
また最新の情報は,
[http://www.ndu.ac.jp/~karakasa/h-nmr\(j\).htm](http://www.ndu.ac.jp/~karakasa/h-nmr(j).htm) に記載して
ます。